

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze dello sviluppo e del movimento umano

Ciclo XXIV

Settore Concorsuale di afferenza: H5

Settore Scientifico disciplinare: Bio 17

TITOLO TESI

**Effetti cellulari e molecolari del farmaco CRM197 sulla
linea di carcinoma del colon HT-29**

Presentata da: Stefano Rivetti

Coordinatore Dottorato

Relatore

Prof.ssa Elisabetta Caramelli

Dott.ssa Rossella Solmi

Esame finale anno 2012

INDICE

INTRODUZIONE	pag 2
1 Il carcinoma del colon-retto	
1.1 Incidenza della malattia	pag 2
1.2 Cause e fattori di rischio	pag 3
1.3 Patogenesi	pag 6
1.4 Progressione adenoma-carcinoma	pag 8
1.5 Sistemi molecolari implicati nella patogenesi	pag 10
1.6 Forme ereditarie	pag 13
1.7 Classificazione istologica – anatomica	pag 14
1.8 Diagnosi	pag 15
1.9 Clinica	pag 20
1.10 Terapia	pag 22
2 Cross Reacting Material 197 (CRM197)	pag 24
3 SCOPO DELLA TESI	pag 26
4 MATERIALI E METODI	
4.1 CRM197	pag 28
4.2 colture cellulari	pag 28
4.3 Vitalità cellulare	pag 28
4.4 Analisi del ciclo cellulare	pag 29
4.5 Immunoistochimica	pag 29
4.6 Microscopia elettronica a scansione	pag 30
4.7 Estrazione dell'RNA totale, qPCR Real Time e ibridizzazione su array di cDNA	pag 32
4.8 Acquisizione di immagini degli array	pag 33
4.9 Analisi dei dati	pag 34
5 RISULTATI	
5.1 Vitalità cellulare con Trypan Blue	pag 35
5.2 Analisi del ciclo cellulare con citofluorimetria a flusso	pag 36
5.3 Immunoistochimica	pag 37
5.4 Microscopia elettronica a scansione	pag 38
5.5 cDNA microarray e analisi dei dati	pag 39
5.6 Real time qPCR	pag 41
6 DISCUSSIONE	pag 42
7 BIBLIOGRAFIA	pag 47

INTRODUZIONE

1. Il carcinoma del colon-retto

1.1 incidenza della malattia

Il cancro al colon ha un'incidenza in Italia di circa 40 nuovi casi ogni 100000 abitanti, con un picco di incidenza tra la quinta e la settima decade ed occupa il secondo posto per mortalità tumorale nell'uomo e il terzo nella donna^{[1][2]}. Il cancro del colon colpisce indifferentemente entrambi i sessi, il cancro del retto invece ha un'incidenza con un rapporto maschi : femmine di circa 2:1^[3]. Le sedi maggiormente colpite sono il retto (nel 39% dei casi) e il sigma (nel 25% dei casi), presente però in tutti i distretti coloretali.

Con cancro colon-rettale si indica quindi qualsiasi neoplasia avente sede tra l'inizio del cieco e il retto.

1.2 Cause e fattori di rischio

Tra le cause di questo tumore risulta preponderante la componente genetica, solitamente infatti le cellule di questo cancro possiedono mutazioni ereditate o acquisite a carico di geni coinvolti nella via di trasduzione del segnale Wnt, e/o nella replicazione o riparazione del DNA ^[4].

Risulta comunque chiara la presenza di altri fattori che influenzano il rischio di contrarre questa malattia tra i quali:

-Età: l'incidenza di CRC aumenta con l'età. Risulta essere raro in soggetti con età inferiore ai 50 anni se non associati a condizioni di predisposizione familiare.

-Presenza di polipi:

-Nei polipi possono essere presenti aree con diverse caratteristiche maligne, mentre lesioni localizzate nel carcinoma del colon-retto sono riconducibili a precedenti formazioni polipoidi^[5].

-I soggetti con polipi hanno maggiore probabilità di sviluppare CRC^[6], in stretta dipendenza con il numero di polipi.

-La polipectomia riduce l'insorgenza di CRC.

-Familiarità:

-La presenza di parenti di 1° e 2° grado con poliposi adenomatosa familiare (FAP) o cancro coloretale ereditario

non poliposico (HPNCC) aumenta il rischio di contrarre CRC.

-Fumo:

-I soggetti fumatori hanno una mortalità per CRC maggiore rispetto ai soggetti non fumatori.

Il rischio è circa del 40% in più nelle donne fumatrici rispetto alle non fumatrici, mentre è del 30% per gli uomini fumatori rispetto ad i non fumatori. ^[7]

-Dieta:

- L'insorgenza di CRC^[8] è aumentata in soggetti con una dieta caratterizzata da un alto contenuto di grassi e proteine, a causa dell'elevato potere cancerogeno dei cataboliti proteici e del colesterolo. Altri studi confermano l'importanza del consumo di fibre e frutta come fattori di protezione^[9]. Vitamine ed antiossidanti della frutta, come la vitamina C, sono in grado di proteggere le cellule dallo stress ossidativo.

-Fattori ambientali.

-Risulta evidente che soggetti residenti in aree industrializzate hanno un rischio maggiore per lo sviluppo di CRC^{[1][6]}.

-Presenza di processi infiammatori cronici dell'intestino, come il morbo di Crohn e la rettocolite ulcerosa^{[9][10]}:

-Ormoni:

-Le differenze di incidenza tra maschi e femmine possono essere attribuite al diverso pattern ormonale tra i due sessi; in particolare, l'attenzione è stata posta sugli estrogeni^[11], nonostante i dati attualmente presenti siano contrastanti e richiedano ulteriori ricerche.

1.3 Patogenesi

Il cancro del colon-retto è un classico esempio di patogenesi *multistep*^[1]: affinché si possano accumulare le mutazioni necessarie alla genesi del carcinoma invasivo occorrono diversi momenti patologici caratterizzati dalla acquisizione di funzione di un proto-oncogene o dalla perdita di funzione di un oncosoppressore.

Le mutazioni genetiche responsabili del cancro sporadico del colon-retto, sono le stesse che caratterizzano le forme ereditarie^[12]; in particolare a livello genetico molecolare esistono due modelli principali di sviluppo del carcinoma colon-rettale.

Il primo (circa nell'85% dei casi) progredisce secondo il modello adenoma-carcinoma, partendo quindi da un'origine adenomatosa. Questo è caratterizzato da marcate alterazioni del cariotipo, delezioni alleliche, aneuploidia ed inattivazione di importanti geni oncosoppressori quali *Adenomatosis polyposis coli* (APC), *v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (KRAS), geni localizzati sul braccio lungo del cromosoma 18 e *protein 53* (p53).

Il secondo modello è caratterizzato invece da instabilità nei microsatelliti (MSI) e comprende i casi di cancro ereditario non poliposico (HNPCC) e circa il 15% dei carcinomi sporadici.

In questi tumori, definiti MSI-H, le alterazioni del cariotipo risultano lievi, non si presentano casi di aneuploidia e rare risultano anche delezioni alleliche e mutazioni a carico di p53. Caratteristica genetica primaria risulta quindi l'accumulo di mutazioni in brevi sequenze ripetute nella porzione codificante di numerosi geni, tra i quali annoveriamo *transforming growth factor β type II receptor*

(TGF β RII), *BCL2-associated X protein* (BAX) insulin growth factor type II receptor (IGFRII). Tali alterazioni sono il risultato di un malfunzionamento del sistema di riparazione del DNA, in particolare del DNA “mismatch repair” (MMR) dovuto nella maggioranza dei casi ad un’inattivazione dei geni MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (MLH1) o MutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (MSH2).

Lo sviluppo da adenoma a carcinoma risulta anche analizzando i tumori MSI-H ereditari, dove tuttavia la progressione da adenoma a carcinoma risulta più rapida che nel primo modello; nei tumori sporadici invece l’istogenesi non è ancora stata determinata con certezza.

1.4 Progressione Adenoma-Carcinoma

La progressione adenoma-carcinoma è rappresentata dal punto di vista teorico da due diverse ipotesi tra loro discordanti: la cosiddetta “bottom up” e la “top down” [13].

La prima teoria localizza come principio della trasformazione neoplastica le cellule staminali localizzate nella base della cripta, le quali, in seguito a mutazioni a carico di diversi geni, perdono il controllo della proliferazione e invadono la regione apicale.

La seconda teoria è stata formulata successivamente all’analisi di campioni di cripte displastiche, dal quale è risultato che le cellule presenti nel lume apicale avevano un maggior tasso di mutazioni.

Le mutazioni prese in esame, in particolare, erano rappresentate da mutazioni in APC, di KI67 e dall’attivazione della β -catenina nucleare.

Le cellule della base della cripta nei campioni studiati apparivano morfologicamente normali ed era presente una netta demarcazione tra cellule normali e neoplastiche.

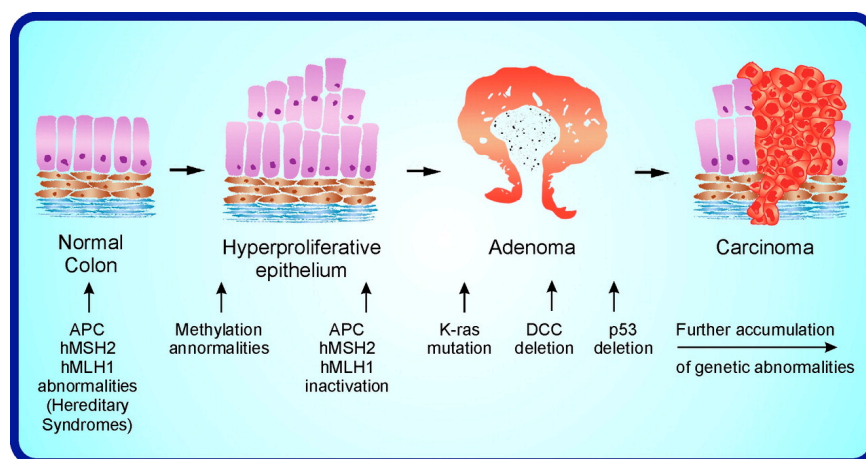


Figura 1: Schema della progressione adenoma-carcinoma

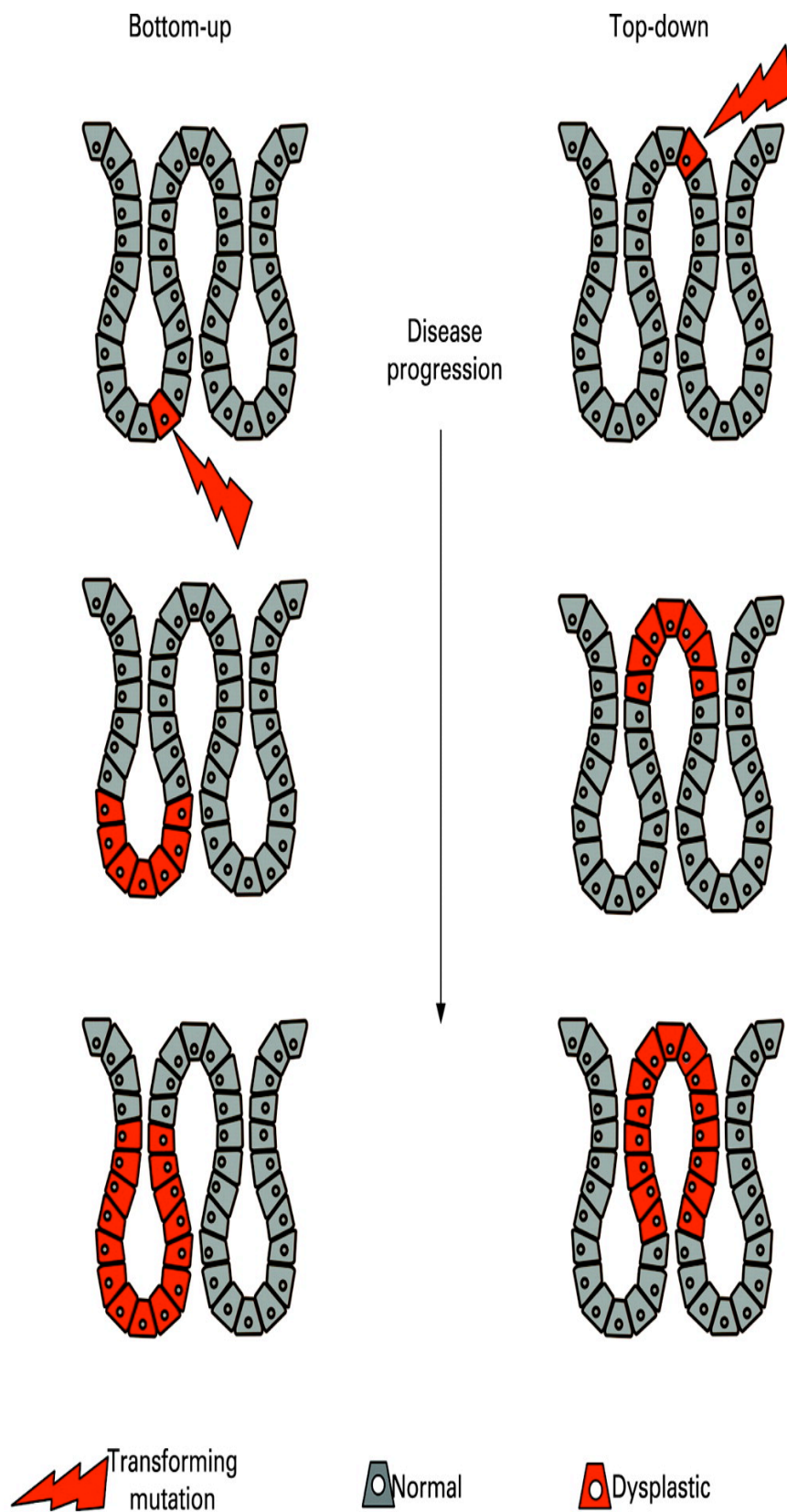


Figura 2: Schema della due teorie di sviluppo, Bottom-up e Top-down.

1.5 Sistemi molecolari implicati nella patogenesi

-Via dell'APC/ β -Catenina

Nel caso in cui il CRC non sia correlabile ad un precedente complesso sindromico genetico (CRC sporadico), il gene Adenomatous Poliposis Coli (APC) è mutato nell' 80% dei casi.

I tumori sporadici senza coinvolgimento di APC presentano invece mutazioni della β -catenina, proteina appartenente ai complessi di trasduzione e di adesione e modulata da APC. APC è una *shuttle protein*, una proteina cioè in grado di attraversare la membrana nucleare. Quando APC si trova nel citoplasma lega una serie di proteine tra cui la assina, la glicogenosintasi chinasi 3 β (GSK-3 β) e la β -catenina, componente delle giunzioni aderenti che lega il citoscheletro a proteine di membrana appartenenti alla famiglia delle caderine; β -catenina inoltre media il proprio accumulo ed una successiva traslocazione nel nucleo. I livelli di β -catenina nella cellula sono regolati dalla sua associazione con il complesso APC, assina e GSK-3 β , complesso attraverso cui la β -catenina viene fosforilata, ubiquitinata e destinata alla degradazione attraverso il proteasoma^[14]. In caso di APC non funzionante, per mutazione di uno dei membri del complesso, si attua un accumulo di β -catenina, prima a livello citosolico da dove, una volta raggiunti sufficienti livelli, trasloca al nucleo legando i membri della famiglia di fattori di trascrizione Tcf/Lef con conseguente regolazione dell'espressione di specifici geni, molti dei quali coinvolti nella proliferazione cellulare, quali c-Myc e la ciclina D1.^[15]

-EGFR

L'espressione aberrante dell'EGFR (recettore per il fattore di crescita epidermico) è comune nell'80% circa dei carcinomi del colon. La sua attività è stata associata a numerose vie, tra cui la sopravvivenza cellulare, l'apoptosi, l'angiogenesi, la motilità e l'invasione ^[16].

La sua struttura molecolare, comune agli altri 3 membri della famiglia dei recettori ErbB (ErbB2 o HER2/neu, ErbB3, ErbB4) include una regione extracellulare, un dominio transmembrana ed un dominio citoplasmatico tirosin-chinasico ^[17]. La regione extracellulare è deputata al legame con il fattore di crescita, l'EGF (fattore di crescita epidermico). Il legame di EGF determina la dimerizzazione di EGFR o con altre molecole di EGFR (omodimerizzazione) o con altri recettori strettamente correlati (eterodimerizzazione), quali, per esempio, HER2/neu ^[18]. Segue una fosforilazione del dominio tirosin-chinasico che innesca vie di segnalazione intracellulare relative alla proliferazione cellulare ed al differenziamento ^[19].

Nel carcinoma del colon il livello di espressione/attivazione di EGFR correla con una mancata risposta ai farmaci, con la progressione della malattia e con una minore sopravvivenza ^[20].

Nel 1980 si è iniziato a considerare il percorso di segnalazione dell'EGFR quale potenziale bersaglio per la terapia del cancro ^[21,22] attraverso l'uso di anticorpi monoclonali (Mabs) che competono con l'EGF per il legame al dominio extracellulare o, in alternativa, di inibitori del dominio tirosin-chinasico a basso

peso molecolare (TKIs) che agiscono impedendo il legame dell'ATP e quindi la funzionalità recettoriale. ^[23].

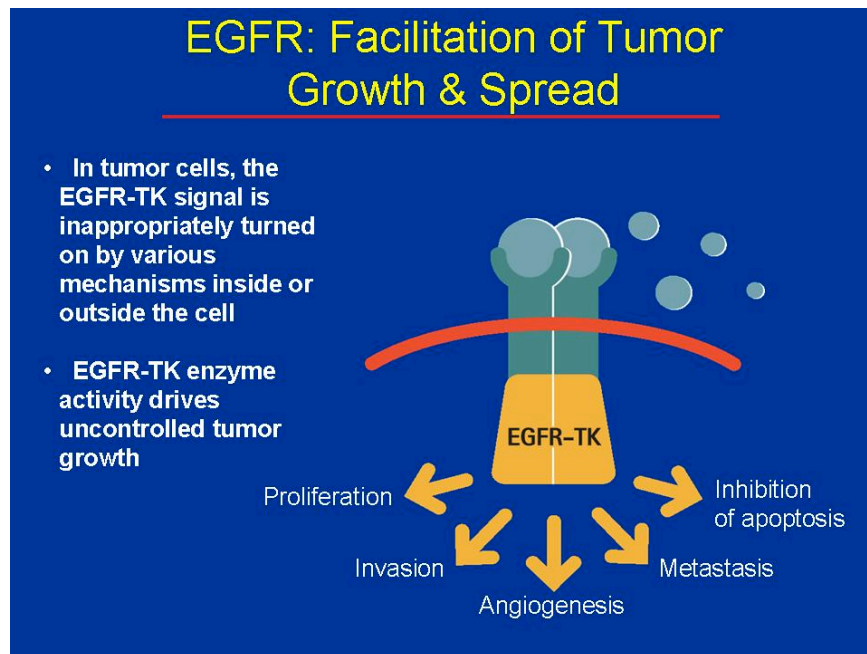


Figura 3: Recettore tirosin-chinasico EGFR

1.6 Forme ereditarie

Esistono due forme familiari note di tumori del colon-retto, entrambe trasmesse secondo ereditarietà autosomica dominante: la poliposi adenomatosa familiare (FAP) ed il cancro colon-rettale ereditario non poliposico (HNPCC).

La FAP è una patologia caratterizzata dallo sviluppo di un altissimo numero di lesioni benigne (di tipo poliposico) non trattabili individualmente, sicchè alcune di esse progrediscono divenendo invasive e dando quindi origine ad un cancro.

Dal punto di vista genetico-molecolare uno dei fattori più evidenti in pazienti con FAP risulta la delezione del braccio lungo del cromosoma 5, in particolare una strettissima associazione tra la regione 5q21 e lo sviluppo della patologia.

Successivamente è stato identificato il gene APC riconosciuto responsabile della FAP tramite studi di segregazione di alleli mutanti di APC in parenti che sviluppavano la patologia.

La HNPCC, conosciuta anche come sindrome di Lynch é caratterizzata oltre che da un aumentato rischio di carcinoma del colon anche di altri tipi di cancro in numerosi altri organi quali: endometrio, ovaio, stomaco, intestino, tratto epato-biliare, cervello e pelle.

Dal punto di vista genetico molecolare la HNPCC presenta difetti nel sistema di riparazione del DNA dovuti ad instabilità dei microsatelliti.

I geni maggiormente colpiti da queste mutazioni sono: MLH-1 e MSH2, mutati nel 90% dei casi, MSH6, PMS e PMS2 in maniera minore (5-10% dei casi).

1.7 Classificazione Istologica - Anatomica

Aspetto macroscopico:

I tumori del colon retto possono essere vegetanti (protrudono nel canale intestinale), ulcerati, infiltranti la mucosa (margini netti e poco rilevati, rari) e anulare stenosanti (a forma di anello intorno alla mucosa intestinale).

Aspetto microscopico

La classificazione dell'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) suggerisce la suddivisione in tumori epiteliali, carcinoidi, non epiteliali e del sistema emopoietico^[23]. Il tipo più diffuso è l'adenocarcinoma (95%)^[24], tuttavia si possono presentare anche:

- Tumori epiteliali quali: adenocarcinoma mucinoso, adenocarcinoma con cellule ad anello con castone, carcinoma squamoso, carcinoma adeno-squamoso e carcinoma indifferenziato.
- Carcinoidi: a cellule argentaffine o non, carcinoide composito.
- Tumori non epiteliali quali leiomiosarcomi e sarcomi.

1.8 Diagnosi

Metodi di screening del cancro del colon-retto

La diagnosi precoce del cancro del colon-retto risulta essere di importanza cruciale in quanto le opzioni di trattamento per i pazienti in stato avanzato risultano limitate.

Nello stadio iniziale dello sviluppo patologico infatti la prospettiva di sopravvivenza è significativamente maggiore, da cui nasce la necessità di mettere a punto una metodica da utilizzare come test di screening sulla popolazione.

I criteri per lo sviluppo o l'applicazione di un test di screening per il cancro secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità sono: accettabilità, praticità ed accessibilità.

Infine un test di screening deve avere un'alta specificità ed un'alta sensibilità ^[25]. Un test con bassa specificità determinerebbe un'alta percentuale di falsi positivi con conseguente aumento dei costi e compromissione della sua efficacia. Per alta sensibilità si intende invece la probabilità che il test risulti positivo in persone che hanno la patologia; l'efficacia di un test di screening non può essere superiore alla sua sensibilità; un risultato di falso negativo impedisce al soggetto di sottoporsi al trattamento.

Il periodo di insorgenza del tumore a partire dalla lesione pre-neoplastica è di circa 5-10 anni e la diagnosi preventiva permette un'ottima opportunità di intervento tramite rimozione chirurgica degli adenomi ed evita il progredire della patologia. Gli adenomi

nelle società occidentali colpiscono circa il 30% degli individui adulti e, considerato che non tutti gli adenomi evolvono in cancro é importante stabilire quali di essi progrediranno in senso maligno, ma ancora più importante è individuare i portatori di tali lesioni pre-neoplastiche. Questo tipo di patologia al manifestarsi dei sintomi risulta essere già in fase avanzata e, nella maggioranza dei casi quindi incurabile, pertanto si comprende quanto sia importante la messa a punto di un test di screening.

Negli ultimi vent'anni molte ricerche hanno supportato l'importanza dello screening per il cancro del colon-retto nella riduzione della mortalità. Gli attuali test di screening sono tutti scarsamente applicabili alla totalità della popolazione, per problemi di costi, attrezzature e personale medico sufficiente.

Le principali tecniche utilizzate sono:

Test del sangue occulto nelle feci (FOBT)

E' un esame facilmente applicabile ed economico, fondato sul presupposto che la maggior parte delle lesioni neoplastiche causa sanguinamento della parete intestinale sin dalle prime fasi di sviluppo. Partendo da questa ipotesi i campioni di feci sono analizzati in laboratorio per la presenza di minime quantità di sangue. Il FOBT è il test di screening maggiormente applicato e tende a determinare una diminuzione della mortalità. Prove cliniche randomizzate e controllate su un alto numero di pazienti mostrano infatti una riduzione statisticamente significativa della mortalità da cancro del colon-retto negli individui sottoposti

regolarmente all'analisi del sangue occulto nelle feci. L'efficacia, che peraltro dipende dalla frequenza dei controlli, comunque non è mai superiore al 30%.

Il FOBT presenta comunque gli svantaggi dovuti ad una bassa sensibilità (la maggior parte degli adenomi non sanguina) ed una bassa specificità, con un'elevata incidenza di falsi positivi che implicano costi supplementari per indagini mediche più approfondite (soltanto il 5% circa dei soggetti positivi al test presenta cancro del colon-retto invasivo) ^[25].

Esami di indagine endoscopica

A differenza dell'analisi indiretta eseguita con il FOBT esistono 2 tecniche di visualizzazione diretta della parete intestinale, atte ad individuare polipi adenomatosi precancerosi o il cancro, tramite endoscopia.

La sigmoidoscopia prevede l'introduzione di uno strumento ottico attraverso il retto per esaminare direttamente il colon. Questa metodica ha mostrato una buona riduzione della mortalità per il cancro del colon-retto (dal 65% al 90%) ^[26, 27], restando tuttavia poco utilizzata a causa del disagio del paziente per l'invasività dell'esame stesso, unita al fatto che la sigmoidoscopia esamina solo metà del colon, non riuscendo a raggiungere il colon prossimale ^[28]; il rischio di presenza di adenoma precanceroso o di cancro a livello prossimale in individui con sigmoidoscopia negativa è valutabile attorno all'1-2%.

L'altra metodica endoscopica utilizzata é la colonscopia, considerata l'indagine ottimale per individuare il cancro del colon-retto, essendo capace di individuare lesioni anche nel colon prossimale ^[29]. I problemi principali, oltre all'invasività dell'esame sono un aumento del rischio di complicazioni a fronte di un incremento delle percentuali di diagnosi non sufficientemente elevato rispetto all'impiego della sigmoidoscopia.

Enteroclasma al bario

L'enteroclasma al bario è un test radiologico nel quale il bario è infuso attraverso un clistere nell'intestino e vengono effettuate foto radiografiche per identificare polipi o cancro. Tuttavia pochi sono i risultati a supporto della sua efficacia. Diversi studi hanno evidenziato significativi problemi relativi alla sua bassa sensibilità nell'evidenziazione dei polipi.

Colonscopia virtuale

La colonscopia virtuale è una tecnica che utilizza la scansione tomografica computerizzata a spirale per creare immagini bidimensionali e tridimensionali simulate della superficie luminale del colon. Questo esame ha elevate sensibilità e specificità, individuando l'80-90% dei polipi, con una specificità del 90-100% per quelli di maggiori dimensioni ^[30] e del 60-65% per i polipi di minori dimensioni.

Dal punto di vista dei problemi della metodica, il maggiore é sicuramente rappresentato dal costo (il 50% in più rispetto alla colonscopia standard), inoltre l'analisi dei dati può richiedere un tempo variabile da 10 minuti ad 1 ora; questo rende improponibile il suo utilizzo come test di screening.

Metodi di analisi molecolare

Ultime ricerche, soprattutto nel campo delle biotecnologie e della biologia molecolare tendono ad individuare marcatori molecolari da utilizzare per l'identificazione di pazienti con cancro del colon-retto ^[30, 31].

1.9 Clinica

I siti maggiormente colpiti da CRC sono il retto e il colon sigma. Inizialmente, i sintomi possono essere lievi e non indicativi, successivamente può invece comparire un'anemia sideropenica, dovuta al sanguinamento. Le localizzazioni a destra, portano alla perdita occulta di sangue, astenia e calo ponderale mentre le localizzazioni a sinistra possono invece manifestarsi con sanguinamento visibile che conduce raramente ad anemia.

Le alterazioni dell'alvo sono relative alla localizzazione del CRC; infatti, nelle localizzazioni a destra l'alvo tende ad essere diarroico (deficit di assorbimento), mentre nelle localizzazioni a sinistra si ha stipsi. Nelle localizzazioni rettali può esserci tenesmo e restringimento del calibro delle feci.

Il dolore rappresenta un sintomo tardivo che testimonia l'invasione dei plessi nervosi da parte del tumore. La propagazione può avvenire per via infiltrativa andando a colpire organi attigui quali la vescica, la vagina, la prostata, le vescicole seminali, l'intestino tenue e lo stomaco. La metastatizzazione per via linfatica è frequente, andando a colpire i linfonodi epicolici e paracolici. A livello del retto esistono tre vie principali di deflusso linfatico^[32], ognuna delle quali è connessa con la relativa arteria emorroidaria: il distretto linfonodale superiore, il medio e l'inferiore.

La disseminazione per via ematica assume un ruolo di rilievo soprattutto diretta verso il fegato, in virtù della stretta connessione portale con l'intestino. Inoltre è possibile ritrovare metastasi nei corpi vertebrali dovuti alle anastomosi porto-cavali in grado di

convogliare il sangue verso le strutture dello scheletro.

I sintomi a livello sistemico possono essere febbre, palpitazioni, pallore, cachessia ed astenia.^{[1][6]}

1.10 Terapia

Dal punto di vista terapeutico la chirurgia rappresenta il primo e più importante presidio ^[6] e consiste in una larga resezione del tratto di intestino seguita da una valutazione della cavità peritoneale per escludere la presenza di malattia residua o metastatica.

La terapia adiuvante è indicata nei pazienti in stadio C mentre non esistono indicazioni condivise per lo stadio II o B2-3.

Gli schemi possibili sono:

- 5-fluorouracile + acido folinico
- capecitabina
- schema FOLFOX (Oxaliplatino + 5-fluorouracile e Acido folinico)
- schemaXELOX (oxaliplatino + capecitabina)

La chemio-radioterapia neoadiuvante viene utilizzata solo nel carcinoma del retto ed i suoi obiettivi clinici sono la riduzione dell'estensione tumorale, in modo da praticare l'intervento senza l'interessamento dello sfintere anale e del muscolo elevatore dell'ano, l'aumento della sopravvivenza media e la diminuzione della tossicità rispetto alla terapia adiuvante.

Essa è quindi particolarmente indicata per casi di malattia in stadio avanzato o in pazienti con interessamento dello sfintere anale. Normalmente è effettuata solo la radioterapia; in ambito di studi clinici si possono associare i chemioterapici (di solito il 5-fluorouracile + acido folinico e la capecitabina).

Per quanto riguarda la terapia del carcinoma metastatico, essa ha come obiettivi principali l'aumento della sopravvivenza e della qualità della vita, tenendo conto del fatto che la guarigione resta comunque possibile sotto particolari condizioni.

La chemioterapia del tumore metastatico si avvale principalmente del 5-fluorouracile, in infusione continua per limitare gli effetti collaterali, associato o meno con altri farmaci antitumorali (irinotecan e/o oxaliplatino) o ad anticorpi monoclonali (cetuximab, panitumumab, bevacizumab).

Purtroppo la guarigione non è un obiettivo verosimile del trattamento del carcinoma del colon o del retto con metastasi a distanza, a meno che non si tratti di noduli che possono essere completamente asportati chirurgicamente (eventualmente dopo una chemioterapia sistemica).

Il bevacizumab va sospeso in caso di interventi chirurgici in quanto aumenta il rischio di emorragia.

2. Cross Reacting Material 197 (CRM197)

Il CRM197 appartiene ad un gruppo di mutanti della tossina difterica ottenuti nei primi anni 70 da ceppi di *Corynebacterium diphtheriae* lisogenizzati con β -phage portanti un gene della tossina mutato. A differenza della tossina difterica *wild type*, che inibisce la sintesi proteica negli eucarioti inattivando il fattore di allungamento 2 (EF-2) tramite ribosilazione ADP dipendente in presenza di NAD^+ , il CRM197 risulta essere non tossico a causa di una sostituzione amminoacidica da glicina ad acido glutammico in posizione 52, che rende il CRM197 incapace di legare il NAD^+ e, pertanto, enzimaticamente inattivo. Il CRM197 è immunologicamente indistinguibile dalla tossina difterica *wild type* e mantiene la capacità di legarsi a recettori della membrana cellulare ^[33]. In particolare il recettore della tossina difterica è l'*heparin binding epidermal growth factor* (HB-EGF), membro della superfamiglia dei fattori di crescita che compete per il recettore *epidermal growth factor* (EGFR), espresso in diversi tipi cellulari e spesso sovraespresso nel cancro del colon-retto.

La tossina difterica ha dimostrato di avere azione antitumorale sia nei topi sia nell'uomo ^{[34] [35]}, azione che tuttavia è risultata essere accompagnata da effetti collaterali considerevoli. Recentemente è stata quindi dimostrata l'efficacia del mutante CRM197, di tossicità notevolmente inferiore, nella cura di diversi tipi di cancro, nonostante la sua modalità d'azione rimanga in larga parte tuttora ignota.

Il CRM197 si lega alla forma ancorata alla membrana di HB-EGF (proHB-EGF), il quale contiene un dominio extracellulare EGF-like, un segmento transmembrana e una breve coda citoplasmatica [36].

Questa viene tagliata a livello del dominio juxtamembrana tramite metalloproteinasi, liberando il ligando solubile di EGFR, HB-EGF, lasciando un segmento citoplasmatico (HB-EGF-CTF) [37].

HB-EGF compete poi con i ligandi di EGFR e ErbB4 [37] [38], funzionando come fattore autocrino e paracrino con una potente azione mitogenica e chemotattica.

Alti livelli di espressione di HB-EGF rispetto a tessuti sani sono stati riscontrati in differenti tipi di tumore, tra cui il carcinoma del colon [39].

Il CRM197 inibisce l'attività mitogenica dell' HB-EGF impedendo il suo legame ai recettori ErbB senza influenzare però altri ligandi.

3 SCOPO DELLA TESI

Durante i tre anni di dottorato la nostra ricerca ha mirato a studiare gli effetti cellulari e molecolari del farmaco CRM197 sulla linea cellulare di carcinoma del colon HT-29.

Vista l'importanza del recettore EGFR abbiamo infatti ritenuto interessante valutare l'effetto del CRM197, potente inibitore di uno dei suoi ligandi, l'HB-EGF, poco studiato nel carcinoma del colon.

Oltretutto l'azione del CRM197 rimane poco conosciuta a livello molecolare, infatti la principale azione diretta sull'organismo (l'attivazione del sistema immunitario) ha occupato la grande maggioranza dei ricercatori con studi in vivo, lasciando oscuri molti fenomeni molecolari di base.

La linea cellulare HT-29 inoltre è una delle più studiate di questo tipo di tumore ed esprime livelli endogeni di HB-EGF paragonabili a livelli di altre linee prese in esame in differenti studi.

L'azione del CRM197 inoltre risulta specifica per l'HB-EGF implicato nella via di EGFR in quanto il secondo recettore del ligando, ErbB4, non è presente.

Le indagini da noi svolte sono partite da studi di tipo cellulare quali: curve di crescita, saggi di vitalità cellulare, analisi del ciclo cellulare tramite citofluorimetria e studi morfologici delle cellule trattate tramite microscopia elettronica a scansione.

Questi studi hanno permesso quindi di valutare gli effetti del farmaco sulla crescita e sulle eventuali modificazioni indotte dal

farmaco sui regolatori del ciclo cellulare, sull'eventuale attivazione dell'apoptosi e su modificazioni della morfologia cellulare.

In secondo luogo, dal punto di vista delle indagini di tipo molecolare, abbiamo effettuato saggi di immunoistochimica sulle cellule trattate con CRM197 utilizzando anticorpi diretti contro EGFR ed EGFR attivato, valutando quindi la percentuale di recettore funzionale.

In seguito sono state effettuate estrazione di RNA totale e, tramite metodica di microarray a due colori, abbiamo sondato lo stato trascrizionale di più di 20000 geni, verificando, tramite analisi statistica, i geni che dimostravano avere una variazione trascrizionale più significativa in seguito al trattamento, confermando poi i risultati ottenuti tramite metodica di real time PCR.

4 MATERIALI E METODI

4.1 CRM 197

Il CRM197 (tossina difterica [Glu52]) è stato fornito dalla ditta SIGMA ed utilizzato per esperimenti *in vitro* alla concentrazione di 1µg/ml.

4.2 Colture cellulari

Le HT-29 sono una linea cellulare derivante da un adenocarcinoma del colon di una donna caucasica di 44 anni (passaggi dal 60 al 65) fornite dall'American Type Culture Collection (ATCC). Sono state coltivate in terreno Dulbecco's minimal essential medium (DMEM), con aggiunta di glucosio 25 mM e L-glutamina 2 mM, antibiotici (penicillina 100 U.mL⁻¹ e streptomina 100 mg.mL⁻¹) e con 10% (v/v) di siero bovino inattivato al calore (Cambrex, Verviers, Belgium). Le cellule venivano fatte crescere in incubatore a 37°C e 5% CO₂ e utilizzate e trattate per ogni esperimento al 70%-80% di confluenza.

4.3 Vitalità cellulare

La crescita cellulare è stata valutata utilizzando una soluzione di Trypan Blue al 10% in una camera di conta Neubauer Brand, (Wertheim, Germany). Le cellule vive (non colorate) e le morte (colorate) venivano contate al microscopio. Le cellule erano seminate in fiasche di 25 cm² (Becton Dickinson Labware Europe Le Pont De Claix, France) alla concentrazione di 4.0 x 10⁵ cellule per fiasca e incubate per 24 ore a 37°C. Le cellule sono state

successivamente trattate con CRM197 e incubate per 24, 48, 72 e 96 ore. Inoltre sono state seminate fiasche non trattate per stabilire il numero iniziale di cellule trattate. Dopo il trattamento le cellule sono state lavate con tampone fosfato salino (PBS) staccate con tripsina ed EDTA alla concentrazione di 0.1% e contate. L'esperimento è stato svolto in triplicati indipendenti.

4.4 Analisi del ciclo cellulare

L'analisi del ciclo cellulare è stata valutata tramite citofluorimetria a flusso. Le cellule HT-29 sono state coltivate per 5 giorni e successivamente trattate per 24 e 48 ore con CRM197.

Dopo averle staccate le cellule sono state lavate 2 volte con PBS e risospese in una soluzione contenente sodio citrato 0,1 %, 0,1 % Nonidet 40, 50 mg/mL di propidio ioduro e 10 mg/mL di RNAsi.

Dopo 30' di incubazione al buio a 37°C, sono stati determinati i profili del ciclo cellulare usando il Beckman Coulter Epic XL MCL Cytometer e analizzati con Modfit software ^[40]. Tre esperimenti indipendenti in triplicato sono stati effettuati su cellule trattate e non trattate.

4.5 Immunoistochimica

Le cellule HT-29 sono state seminate su vetrini BD Falcon (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) a 4 camere, alla concentrazione di 4×10^4 cellule per camera e incubate per 5 giorni. Le cellule sono state successivamente trattate per 24 ore con CRM197.

In seguito sono state fissate in metanolo per 10 min a -20°C. Le cellule venivano poi asciugate per 3-5 min sotto il flusso della cappa e portate a -20°C.

L' immunistochemica da noi effettuata prevedeva una metodica priva di biotina (Novolink, Novocastra Laboratories, Newcastle UK). I vetrini sono stati asciugati per 1 min. a temperatura ambiente (RT) e immersi in una soluzione allo 0,5% di metanolo/H₂O₂ per 10 min. allo scopo di bloccare la perossidasi endogena, lavati 3 volte in acqua distillata e immersi in PBS a pH 7,2-7 per 10 min. Le cellule venivano incubate tutta la notte a temperatura ambiente e in un'atmosfera umidificata utilizzando un anticorpo anti-EGFR (clone 31G7, Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA) diluito 1:120 e un anticorpo specifico per la forma fosforilata del recettore (in tirosina 1173) (Cell Signaling Tech., MA, USA) diluito 1:100. Le cellule erano lavate in PBS e processate usando il "Novolink system" secondo la procedura suggerita dal produttore. La reazione è stata attivata utilizzando 3,3'-diaminobenzidina tetraidrocloride, alla concentrazione di 50 mg/100 ml PBS e attivata con perossido di idrogeno per 10 minuti. I nuclei sono stati marcati con l'ematossilina di Mayer's, asciugati con xylene e montati con BioMount (Bio-Optica, Milano, Italia). Sono stati realizzati 2 esperimenti indipendenti per cellule trattate e non trattate, con 2 replicati.

4.6 Microscopia elettronica a scansione (SEM)

Le HT-29 sono state seminate su vetrini Lab-Tek in Permanox a 4 camere (Nunc, Naperville, IL), alla concentrazione di 4×10^4 cellule per camera e incubate per 5 giorni.

Successivamente le cellule sono state trattate per 24 ore con CRM197.

Per ogni esperimento sono state fatte 2 repliche indipendenti per trattate e non, tramite l'utilizzo di un microscopio SEM (Philips SEM 515, Eindhoven, Olanda). Tutti i vetrini sono stati lavati delicatamente con PBS e le cellule fissate con soluzione di Karnowsky (glutaraldeide 1,5 %, 1% paraformaldeide, 0,1 M tampone cacodilato) per 30 min, per poi essere lavati con tampone cacodilato allo 0,1 M, e fissati per 20 min con Os_2O_4 all'1% in tampone cacodilato, deidratati con etanolo e infine asciugati con esametildisilossano (HDMS) per 15 min.

I vetrini sono stati montati su un supporto con film di carbonio bi-adesivo, coperti con un film di oro palladio di 20 nm e osservati a 15 kV.

4.7 Estrazione dell'RNA totale, qPCR Real Time e ibridizzazione su array di cDNA

Le cellule HT-29 sono state coltivate per 5 giorni e successivamente trattate per 24 ore con CRM197.

L'RNA è stato estratto utilizzando il reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e il protocollo fornito dal produttore.

Il cDNA per la Real Time quantitativa è stato sintetizzato partendo dall'RNA mediante il *SuperscriptII first strand synthesis kit* (ABI, Carlsbad, CA). Tutti gli esperimenti sono stati effettuati in triplicato ed i risultati sono stati normalizzati mediante Beta-2 microglobulina (B2M). I primers utilizzati sono stati:

PPP2CA

forward TGCCTTGGTGGATGGGCAGATCT, PPP2CA

reverse ACCAACGTGAGGCCATTGGCA;

GNAI1

forward GTGCTTGGAGCCCGCACTCGG

reverse AGATTCACCAGCACCGAGCAGCA;

BTN2A1

forward TAGTGCCTGTGCCCCTGGGC

reverse CCCCACGACAATAAACTGGGCTTC;

Septina-6

forward CTTGGTCGCGCCCGAAGTGT

reverse CCTTCACCCACCTGGCGAGC;

B2M

forward GGCATTCCTGAAGCTGAC

reverse TCTTTGGAGTACGCTGGATAG.

L'espressione relativa di ogni gene è stata calcolata con il metodo 2-ddCT^[41]. Abbiamo analizzato l'espressione genica utilizzando l'ibridazione di array SS-H19k8, rappresentanti 19200 cloni di cDNA umani (UHN, Microarray Centre, Toronto, ON, Canada).

Dieci microgrammi di RNA totale sono stati utilizzati per ogni campione. Il cDNA è stato sintetizzato utilizzando il CyScribe Post-Labeling Kit (Amersham Biosciences Europe, Freiburg, Germany) che permette la marcatura con Cy3 e Cy5 del cDNA. Quantità identiche di cDNA marcato sono state poi miscelate nella soluzione di ibridazione DIG Easy e ibridati tutta la notte a 37°C.

Il cDNA delle cellule non trattate è stato marcato con Cy3, mentre quello delle cellule trattate è stato marcato con Cy5. Gli array su vetro sono stati lavati 2 volte per 10' con sodio citrato salino (SSC) e sodio dodecil-fosfato allo 0,1% (SDS) a 42°C, 8 volte per 5 minuti con SSC a temperatura ambiente e 4 volte con SSC diluito 1:10 a temperatura ambiente. Successivamente i vetri sono stati asciugati tramite centrifugazione per 2 minuti a 2000 rpm.

4.8 Acquisizione di immagini degli array

La scansione dei vetrini ibridati con Cy3 e Cy5 è stata effettuata con un GenePix 4000a DNA microarray scanner (Axon, Union City, CA, USA). La potenza del laser per i colori rosso e verde è stata regolata allo scopo di ottenere una intensità del rapporto globale vicina a 1. Ogni spot è stato definito usando una griglia fornita dal produttore, con un aggiustamento manuale per il

posizionamento sul blocco. I dati sono stati ricavati con il software GenePix Pro3.0 (Axon Instruments). Per ogni canale veniva calcolata la mediana dell'intensità dei pixel per ogni spot e per la corrispondente area intorno (background).

L'intensità dei singoli spot è stata calcolata come differenza del segnale mediana dell'intensità e intensità dei pixel dell'area circostante corrispondente, normalizzando poi i dati ottenuti secondo l'intensità totale del singolo canale sul singolo vetrino.

4.9 Analisi dei dati

Tutte le analisi statistiche sui dati di microarray sono stati caricati e manipolati con il software ExpressConverter v2.1, necessario per trasformare i risultati ottenuti con il Genepix in un file del formato corretto (.mev) da poter essere utilizzato con MIDAS v.2.19 (Microarray Data Analysis System). MIDAS è stato utilizzato poi per processare e ri-normalizzare i dati. Crea difatti un file esportabile in Excel che può automatizzare il processo e calcolare il rapporto per ogni gene.

Per selezionare i geni differentemente espressi sono stati considerati come geni up-regolati quelli con un $\text{Log}_2\text{Cy5/Cy3} > 1$ e come geni down-regolati quelli con $\text{Log}_2\text{Cy5/Cy3} < -1$.

5.0 RISULTATI

5.1 Vitalità cellulare con Trypan Blue

Abbiamo testato sulla linea cellulare quattro diverse concentrazioni di CRM197, in particolare 0,5, 1, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$. In accordo con la letteratura abbiamo poi scelto di utilizzare la concentrazione standard di 1 $\mu\text{g/ml}$ per i nostri esperimenti.

A questa concentrazione le cellule HT-29 non hanno mostrato differenze statisticamente significative tra le cellule trattate e quelle non trattate (Fig. 4).

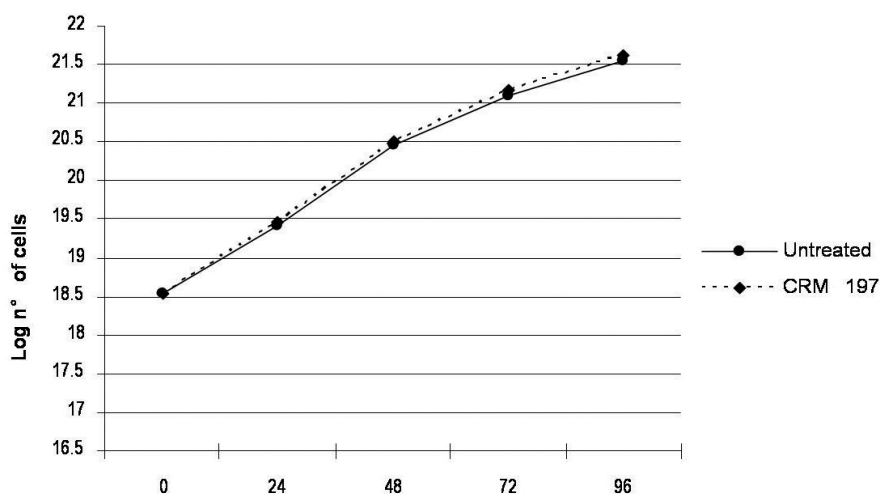


Figura 4: Curva di crescita delle cellule HT-29 trattate con CRM197 e non trattate.

5.2 Analisi del ciclo cellulare con citofluorimetria a flusso

Le analisi del ciclo cellulare sono state effettuate per determinare l'influenza dei trattamenti con CRM197 sulla distribuzione del ciclo cellulare nelle cellule HT-29. Le analisi del ciclo cellulare sono state effettuate a 24 e 48 ore dopo il trattamento con 1 $\mu\text{g/ml}$ del farmaco. La distribuzione delle cellule nelle 3 fasi del ciclo cellulare rimangono invariate con o senza trattamento, con una parte preponderante di cellule nelle fasi G₀/G₁ ed S. (Fig. 5)

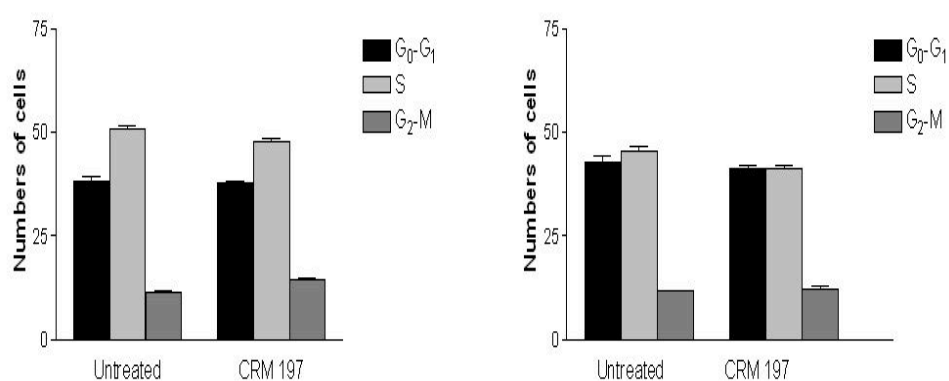


Figura 5: Distribuzione del ciclo cellulare delle cellule HT-29 24 e 48 ore dopo il trattamento con CRM197 e relativo controllo.

5.3 Immunoistochimica

Dopo il trattamento con CRM197 abbiamo eseguito un'analisi di immunoistochimica per EGFR ed EGFR fosforilato (Fig. 6). L'immunoistochimica non ha mostrato differenze tra cellule trattate e non trattate sia per quanto riguarda la quantità di EGFR totale sia per la frazione di EGFR fosforilato.

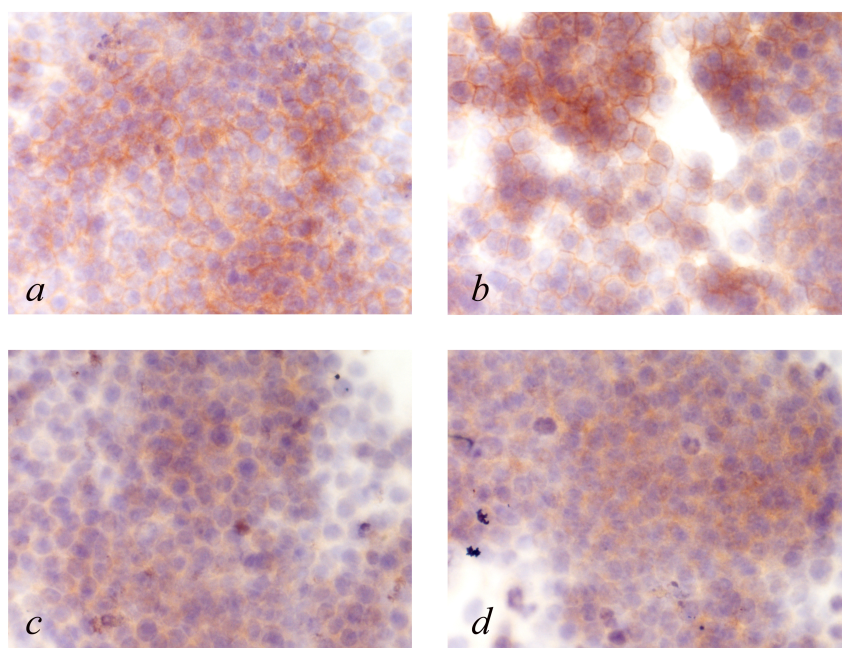


Figura 6: Immunoistochimica di EGFR (a,b) ed EGFR fosforilato (c,d) in cellule non trattate (a,c) e trattate con CRM197 (b,d).

5.4 Microscopia elettronica a scansione

Le cellule HT-29 trattate con CRM197 non hanno mostrato alcuna variazione morfologica statisticamente significativa nell'ultrastruttura, comparate con le cellule non trattate.

La distribuzione dei microvilli, i contatti cellulari e qualsiasi altra caratteristica morfologica è risultata infatti inalterata (Fig.7).

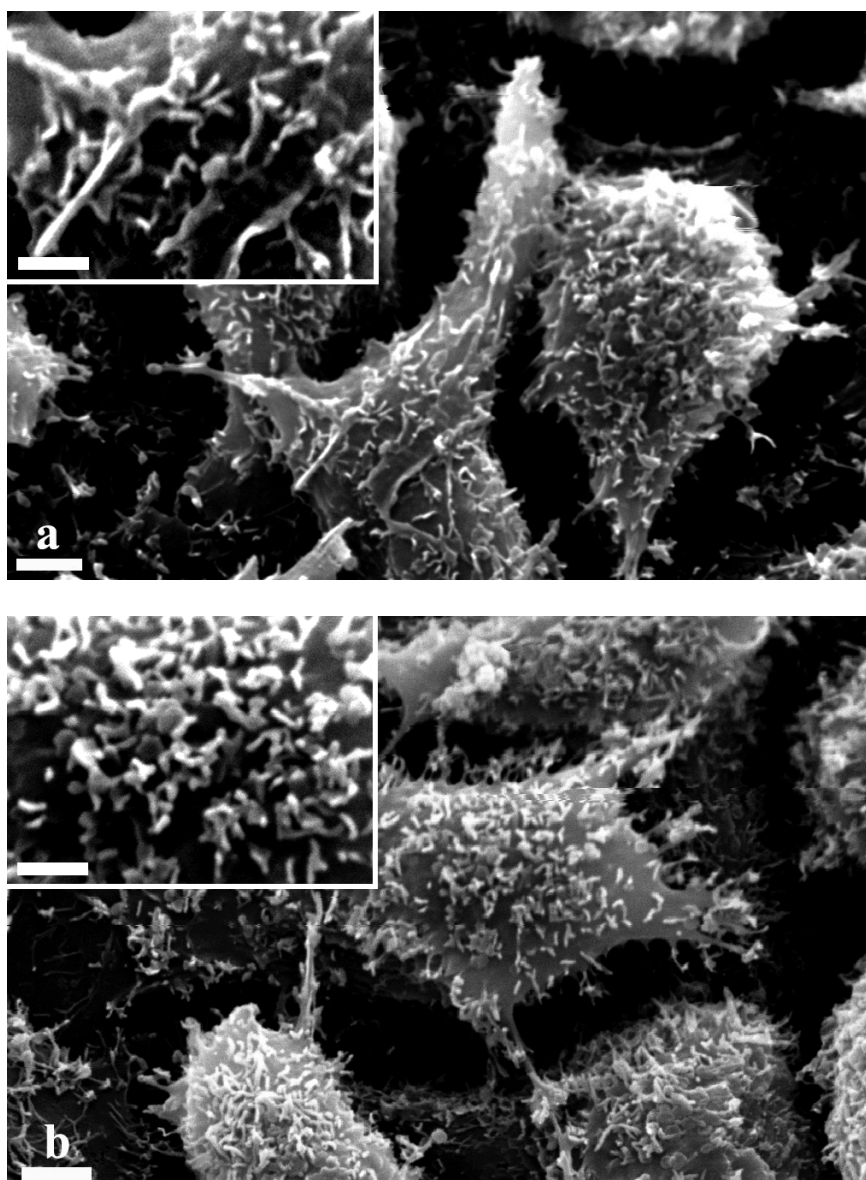


Figura 7: Microscopia elettronica a scansione (SEM) di cellule non trattate (a) e trattate con CRM197 (b), a 4000 e 8000 ingrandimenti.

5.5 cDNA microarray e analisi dei dati

I microarray hanno mostrato modificazioni nell'espressione genica nelle cellule HT-29 trattate con CRM197.

I geni sovraespressi più del doppio rispetto al controllo sono risultati 32 mentre i sottoespressi 30 (Tab.1).

Tra i geni sovraespressi il *guanine nucleotide-binding protein G subunit alpha-1* (GNAI1) e il *cholinergic receptor, muscarinic 1* (CHRM1) sono trasduttori legati a proteine G nei sistemi di segnalazione transmembrana.

Phosphorylase kinase, gamma 2 (PHKG2), *F-box protein 3* (FBXO3) e *protein phosphatase 2, catalytic subunit, alpha isozyme* (PPP2CA) agiscono sulla proliferazione ed il differenziamento cellulare. *Butyrophilin, subfamily 2, member A1* (BTN2A1) codifica per una proteina del plasma coinvolta nel metabolismo di lipidi, acidi grassi e steroli. *ARPI actin-related protein 1 homolog A, contractin alpha* (ACTR1A) e *vacuolar protein sorting 41* (VPS41) codificano per proteine coinvolte nel controllo del traffico vescicolare nel complesso del Golgi.

Bloom syndrome, RecQ helicase-like (BLM) e *cleavage and polyadenylation specific factor 3* (CPSF3) codificano per proteine coinvolte nella replicazione e riparazione del DNA. *Karyopherin alpha 4, importin alpha 3* (KPNA4) funziona come adattatore per il recettore nucleare KPNB1, coinvolto nell'importazione nucleare delle proteine. *Poly rC binding protein 1* (PCBP1) codifica per una proteina che lega acidi nucleici a singolo filamento preferibilmente a oligo dC.

PAX interacting with transcription-activation domain protein 1 (PAXIP1) e *zinc finger protein 415* (ZNF415) sono coinvolti nella regolazione trascrizionale.

Riguardo i geni sottoespressi, *SNW domain containing 1* (SNW1) codifica per un fattore di taglio del pre-mRNA. *Zinc finger protein 486* (ZNF486), *zinc finger, BTB domain containing 17* (ZBTB17) e *activating transcription factor 7 interacting protein* (ATF7IP) sono coinvolti nella regolazione trascrizionale. *Fibulin 5* (FBLN5) e *fibronectin type III extracellular matrix proteins* (FNDC4) promuovono l'adesione. *Retention in endoplasmic reticulum 1* (RER1), *synaptotagmin-13* (SYT13) e *WASH complex subunit 7* (KIAA1033) sono coinvolti nel traffico delle vescicole del Golgi. *S100 calcium binding protein A6, calcyclin* (S100A6), *Septin-6* (Sept-6), *Septin-7* (Sept-7), *Septin-11* (Sept-11) e *stathmin-2* (STMN2) sono implicate nella riorganizzazione del citoscheletro. *Proteasome subunit alpha type-2* (PSMA2), *proteasome, prosome, macropain, 26S subunit, ATPase, 3* (PSMC3), *ubiquitin-like modifier activating enzyme 6* (UBA6) e *F-box protein 30* (FBXO30) sono correlate al riarrangiamento delle protein ubiquitina - ATP dipendente. *NAD synthetase, EC 6.3.5.1* (NADSYN1), *Ubiquinone*, noto anche come *coenzyme Q* (COQ3) e *3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1* (HMGCS1) hanno un ruolo primario nei processi energetici mitocondriali.

Tabella 1: geni che presentano un significativo cambiamento di espressione in cellule HT-29 trattate con CRM197 da risultato di cDNA microarray

Upregulated	
Gene Symbol	Gene Description
GNAI1	Guanine nucleotide-binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polyp 110
CLCN4	Chloride channel 4
TGF-B	Transforming growth factor-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 2
BTN2A1	Butyro Philin, sub-family 2, member A1
SRGN	Secretory granule proteoglycan core precursor
PHKG2	Phosphorylase kinase, gamma 2 (testis)
PHF10	PHD finger protein 10
KPNA4	Karyopherin alpha 4 (importin alpha 3)
PPP2CA	Protein Phosphatase 2 (formerly 2A), catalytic subunit, alpha isoform
CCT3	Chaperonin containing TCP1, subunit 3 (gamma)
CD36	CD36 antigen (collagen type I receptor, thrombospondin receptor)
ACTR1A	ARP1 actin-related protein 1 homolog A, contractin alpha (yeast)
CHRM1	Cholinergic Receptor, Muscarinic 1
NMNAT2	Nicotinamide Nucleotide Adenylyltransferase 2
BLM	Bloom syndrome
CPSF3	Cleavage and polyadenylation specific factor 3, 73kDa
WHSC1	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1
SCCPDH	Saccharopine dehydrogenase
ZNF415	Zinc finger protein 415
STX3	Syntaxin 3
KIAA1109	Hypothetical protein KIAA1109
PCBP1	Poly(rC) binding protein 1
PAXIP1	PAX interacting (with transcription-activation domain) protein 1
BDH1	3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 1
FBXO3	F-box only protein 3
CDNA FLJ46440	CDNA FLJ46440 fis, clone THYMU3016022
VPS41	Vacuolar Protein Sorting 41 (yeast)
KIAA0759	Hypothetical protein KIAA0759
MGC11266	Hypothetical protein MGC11266
EDEM1	ER degradation enhancer, maannosidase alpha-like 1
CDNA FLJ12187	CDNA FLJ12187 fis, clone MAMMA1000831
ELL3	Elongation factor, RNA polymerase II, 2

Downregulated	
Gene Symbol	Gene Description
CPSF7	Cleavage and polyadenylation specific factor 7, 59kDa
SFRS13A	Splicing factor, arginine/serine-rich
SEPT11	Septin 11
ZNF486	Zinc finger protein 486
ZBTB17	Zinc finger and BTB domain containing 17
HMGCS1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble)
ZNF117	Zinc finger protein 117
NADSYN1	NAD synthetase 1
KBTBD3	Kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 3
S100A6	S100 calcium binding protein A6 (calcyclin)
SEPT7	Septin 7
FBLN5	Fibulin 5
STMN2	Stathmin-like 2
ATF7IP	Activating transcription factor 7 interacting protein
MGEA5	Meningioma expressed antigen 3 (yaluronidase)
MMP2	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa type IV collagenase)
PSMA2	Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 2
PEX19	Peroxisomal biogenesis factor 19
PSMC3	Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 3
KIAA1033	KIAA1033 protein
RER1	RER1 homolog (S. cerevisiae)
UBA6	Ubiquitin-like modifier activating enzyme 6
FNDC4	Fibronectin type III domain containing 4
COQ3	Coenzyme Q3 homolog, methyltransferase (yeast)
ADCY10	Adenylate cyclase 10 (soluble)
PRLR	Prolactin receptor
SYT13	Synaptotagmin XIII
SEPT6	Septin 6
FBXO30	F-box protein 30
SNW1	SNW domain containing 1

5.6 Real Time qPCR

I profili di espressione di un gruppo di geni identificati dai microarray come sovraespressi, quali PPP2CA, BTN2A1, GNAI1 o sotto regolati, come Sept6, sono stati analizzati tramite real time PCR. La validazione dell'espressione di questi 4 geni tramite RT-qPCR ha confermato i risultati ottenuti tramite microarray.

In dettaglio la RT-qPCR ha mostrato un aumento di espressione di PPP2CA, GNAI1 e BTN2A1 dalle 3,6 alle 5 volte nelle cellule trattate con CRM197 rispetto alle non trattate (Fig.8).

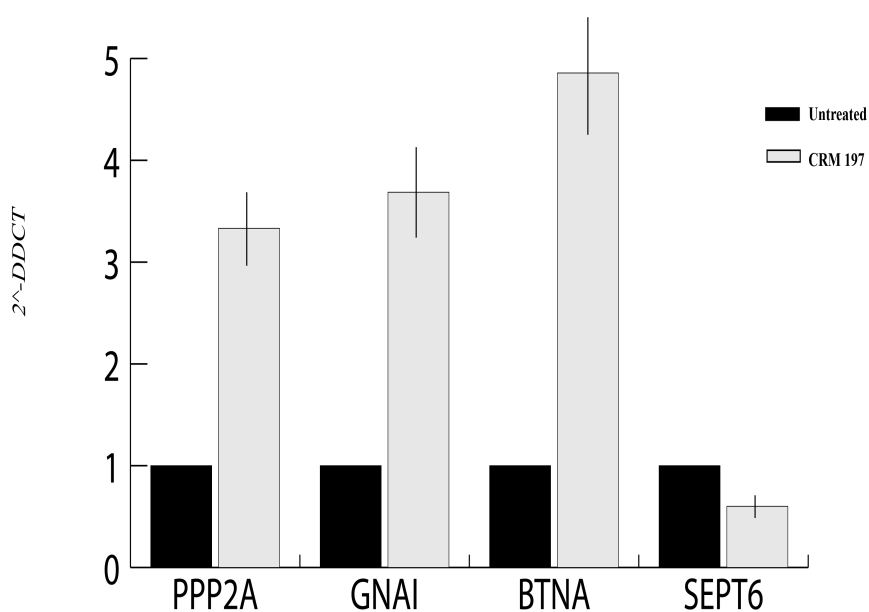


Figura 8: PCR Real Time di cellule trattate con CRM197 e non; i dati quantitativi sono stati normalizzati sulla base dell'espressione nelle cellule non trattate.

6.0 DISCUSSIONE

I ligandi dei recettori ErbB sono numerosi e classificati in quattro gruppi principali, basati sul loro legame diretto ad un membro specifico della famiglia ErbB. EGF, Transforming growth factor – alpha, ed Anfieregulina legano esclusivamente EGFR. Il secondo gruppo include HB-EGF, Betacellulina ed Epiregulina, che legano sia EGFR che ErbB4.

Il terzo gruppo è composto da Neuregulina-1 e Neuregulina-2 che legano ErbB3 ed ErbB4.

Il quarto gruppo, che include Neuregulina-3 e Neuregulina-4, lega solo ErbB4.

Nessun ligando lega direttamente ErbB2, il quale forma degli eterodimeri con gli altri membri della famiglia e implementa il segnale delle tirosin-chinasi.

Nel carcinoma coloretale EGFR è un importante bersaglio di terapia, mentre nessun ligando di EGFR è stato finora considerato.

Ci sono molti vantaggi potenziali nel considerare come bersaglio un ligando di EGFR rispetto al recettore in quanto, ad esempio, HB-EGF non solo lega ed attiva EGFR, ma può legare ed eventualmente attivare anche ErbB2 ed ErbB4.

Il nostro studio, usando il CRM197, valuta l'influenza dell'HB-EGF presente nelle HT-29 sull'espressione di EGFR, il suo stato di attivazione e la risposta delle cellule.

Il trattamento con CRM197 ha mostrato un cambiamento molto interessante del profilo di espressione e l'azione mirata su un

numero ridotto di geni, senza tuttavia modificarne la biologia cellulare.

I nostri microarray realizzati per le cellule HT-29 hanno quindi dimostrato una risposta genica specifica al trattamento con CRM197 senza alcun effetto diretto sull'EGFR.

È stato dimostrato come il CRM197 sia in grado di aumentare le dimensioni degli endosomi ed inibirne la loro successiva maturazione. Noi abbiamo osservato una modificazione indotta dal farmaco dell'espressione di geni collegati alla trasformazione degli endosomi. Abbiamo dimostrato la variazione di geni coinvolti nel traffico di vescicole tra membrana plasmatica e Golgi; geni implicati nella riorganizzazione del citoscheletro e geni correlati al riarrangiamento delle proteine ATP e Ubiquitina-dipendenti.

In particolare abbiamo validato la sovraespressione di PPP2CA, GNAI1 e BTN2A1.

In precedenti studi condotti sulle HT-29, PPP2CA è risultato essere un punto di partenza per i meccanismi apoptotici cellulari, del reticolo endoplasmatico, stress-dipendenti e nei *pathway* MEK/ERK.

GNAI1 è una proteina G che agisce come modulatore o trasduttore in diversi sistemi di segnalazione transmembrana. In particolare è una proteina G inibitoria regolatrice dell'adenilato ciclasi, coinvolta nel *pathway* MAPK/ERK.

BTN2A1 è un membro della sottofamiglia BTN2 delle Butirofilline appartenenti alla superfamiglia delle Ig e codificata da un cluster di

sette geni nella regione sul cromosoma 6 corrispondente a MHC di classe 1.

BTN2A1 è una proteina B-box interna alla membrana plasmatica che contribuisce al metabolismo di lipidi, acidi grassi e steroli.

L'RNA di BTN2A1 è presente in molti tessuti umani, incluse le cellule circolanti del sistema immunitario. Molte Butirofilline e proteine simili hanno funzioni di regolazione del sistema immunitario.

Sebbene nelle HT-29 l'HB-EGF endogeno risulti poco implicato nella sovraespressione di EGFR e nel comportamento delle cellule, le modificazioni mostrate dopo il trattamento con CRM197 possono supportare una possibile efficacia del CRM197 *in vivo*. Nel 1991 infatti è stato dimostrato che l'HB-EGF è espresso nei macrofagi e recenti evidenze sottolineano l'elevata espressione proteica di HB-EGF nella mucosa che circonda l'adenocarcinoma coloretale.

Così i nostri dati *in vitro* sull'HB-EGF nelle cellule di carcinoma del colon rappresentano solo un iniziale approccio del complesso sistema nel quale l'HB-EGF agisce e riconoscono ed evidenziano un ristretto, ma importante gruppo di geni coinvolti nella risposta al CRM197 le cui potenzialità dovranno essere approfondite in successivi studi.

BIBLIOGRAFIA

1. Harrison, Principi di Medicina Interna (16^a edizione), New York
- Milano, McGraw-Hill, 2006.
2. Sezione del sito dell'airc sul cancro del colon-retto
3. Scheda epidemiologica CRC di ccm-network
4. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M.:
**Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences
reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis**, Nature.
1993;363(6429):558-61
5. DeVita, Hellman, Lawrence, DeVita, Hellman, and Rosenberg's
Cancer: Principles & Practice of Oncology (8^a edizione),
Lippincott Williams & Wilkins, 2008.
6. Gianni Bonadonna; Gioacchino Robustelli Della Cuna, Pinuccia
Valgussa, Medicina oncologica, Milano, Elsevier Masson, 2007.
ISBN 978-88-214-2814-2
7. American Cancer Society Smoking Linked to Increased
Colorectal Cancer Risk

8. Chao A, Thun MJ, Connell CJ, McCullough ML, Jacobs EJ, Flanders WD, Rodriguez C, Sinha R, Calle EE. **Meat consumption and risk of colorectal cancer.** JAMA 2005;293:172-82.
9. Gregory L. Brotzman and Russell G. Robertson. **Colorectal Cancer Risk Factors in Colorectal Cancer.** 2006.
10. Jerome J. DeCosse, MD; George J. Tsioulis, MD; Judish S. Jacobson, MPH (1994). **Colorectal cancer: detection, treatment, and rehabilitation.**
11. Do Santos Silva I. Swerdlow A. J. (2007) **sex differences in time trends of colorectal cancer in england and wales: the possible effect of female hormonal factors**
12. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M (1993). **Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis.** Nature 363 (6429): 558–61.
13. Preston SL, Wong WM, Chan AO, Poulsom R, Jeffery R, Goodlad RA, Mandir N, Elia G, Novelli M, Bodmer WF, Tomlinson IP, Wright NA. **Bottom-up histogenesis of colorectal adenomas: origin in the monocryptal adenoma and initial expansion by crypt fission.** Cancer Res. 2003 Jul 1;63(13):3819-

25.1: Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Feb 27; 98(5):2640-5. Epub 2001 Feb 20.

14. Pontieri - Russo - Frati, *Patologia generale (3^a edizione)*, Padova, Piccin

15. Roose J, Huls G, van Beest M, Moerer P, van der Horn K, Goldschmeding R, Logtenberg T, Clevers H. **Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1.** Science. 1999 Sep 17; 285(5435):1923-6.

16. Yarden Y, Sliwkowski M: **Untangling the ErbB signalling network.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2:127–37.

17. Rowinsky EK. **The erbB family: Targets for therapeutic development against cancer and therapeutic strategies using monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors.** *Annu Rev Med* 2004, 55:433-57.

18. Dassonville O, Bozec A, Fischel JL, Milano G: **EGFR targeting therapies: Monoclonal antibodies versus tyrosine kinase inhibitors Similarities and differences.** *Crit Rev Oncol Hematol* 2007, 62:53-61.

19. Bianco R, Melisi D, Ciardiello F, Tortora G: **Key cancer cell signal transduction pathways as therapeutic targets.** *Eur J Cancer* 2006, 42:290-4.
20. Baselga J: **Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy.** *Oncologist* 2002, 7:2-8.
21. Rosell R, Taron M, Reguart N, Isla D, Moran T: **Epidermal growth factor receptor activation: how exon 19 and 21 mutations changed our understanding of the pathway.** *Clin Cancer Res* 2006, 12:7222-31.
22. Mendelsohn J: **Blockade of receptors for growth factors: an anticancer therapy--the fourth annual Joseph H Burchenal American Association of Cancer Research Clinical Research Award Lecture.** *Clin Cancer Res* 2000, 6:747-53
23. Classificazione istologica OMS
24. C.M. Townsend Jr, R.D. Beauchamp, B.M. Evers, K.L. Mattox. **Trattato di chirurgia. Le basi biologiche della moderna pratica chirurgica.** 2003: 929-973
25. Lang CA, Ransohoff DF. **What can we conclude from the randomized controlled trials of fecal occult blood test screening?** *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 10(3):199-204,1998.

26. Newcomb PA, Norfleet RG, Storer BE, Surawicz TS, Marcus PM. **Screening sigmoidoscopy and colorectal cancer mortality.** *J Natl Cancer Inst.* 21;84(20):1572-5, 1992.
27. Selby JV, Friedman GD, Quesenberry CP Jr, Weiss NS. **A case-control study of screening sigmoidoscopy and mortality from colorectal cancer.** *N Engl J Med.* 5;326(10):653-7, 1992.
28. Levin TR, Palitz A, Grossman S, Conell C, Finkler L, Ackerson L, Rumore G, Selby JV. **Predicting advanced proximal colonic neoplasia with screening sigmoidoscopy.** *JAMA.* 5;281(17):1611-7, 1999.
29. Hara AK, Johnson CD, Reed JE, Ahlquist DA, Nelson H, MacCarty RL, Harmsen WS, Ilstrup DM. **Detection of colorectal polyps with CT colography: initial assessment of sensitivity and specificity.** *Radiology.* 205(1):59-65, 1997.
30. Lambrechts AC, Van't Veer LJ, Rodenhuis S. **The detection of minimal numbers of contaminating epithelial tumor cells in blood or bone marrow: use, limitations and future of RNA-based methods.** *Ann Oncol.* 9(12):1269-76, 1998.

31. F.C. Kelleher, D. Fennelly, M. Rafferty. **Common critical pathways in embryogenesis and cancer**, Acta Oncol. 45 375–388, 2006
32. Mazzeo - Forestieri, **Trattato di chirurgia oncologica**, Padova, PICCIN - Nuova libreria, 2003.
33. Giannini G, Rappuoli R, Ratti G. **The amino-acid sequence of two non-toxic mutants of diphtheria toxin: CRM45 and CRM197**. Nucleic Acids Res 1984; 12:4063-9.
34. Buzzi S, Maistrello I. **Inhibition of growth of Erlich tumors in Swiss mice by diphtheria toxin**. Cancer Res 1973; 33:2349-53
35. Buzzi S. **Diphtheria toxin treatment of human advanced cancer**. Cancer Res 1982; 42:2054-8
36. Mitamura T, Higashiyama S, Taniguchi N, Klagsbrun M, Mekada E. **Diphtheria toxin binds to the epidermal growth factor (EGF)-like domain of human heparin-binding EGF-like growth factor/diphtheria toxin receptor and inhibits specifically its mitogenic activity**. J Biol Chem 1995; 270:1015-9.
37. Miyamoto S, Yagi H, Yotsumoto F, Kawarabayashi T, Mekada E. **Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor**

as a novel targeting molecule for cancer therapy. Cancer Sci
2006; 97:341-7

38. Higashiyama S, Abraham JA, Miller J, Fiddes JC, Klagsbrun
M. **A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-
like cells that is related to EGF.** Science 1991; 251:936-9.

39. Raab G, Klagsbrun M. **Heparin-binding EGF-like growth
factor.** Biochim Biophys Acta 1997; 1333:F179-99.

40. Nusse M, Beisker W, Hoffmann C, Tarnok A. **Flow cytometric
analysis of G1- and G2/M-phase subpopulations in mammalian
cell nuclei using side scatter and DNA content measurements.**
Cytometry 1990; 11:813-21.

41. Livak KJ, Schmittgen TD. **Analysis of relative gene
expression data using real-time.**

Parallelamente allo studio sull'azione del CRM197 in vitro, avente come modello molecolare la linea cellulare HT-29 è stato condotto un altro studio in vitro riguardante l'effetto combinato di doxorubicina e timochinone, per il quale è stata utilizzata anche la linea cellulare Caco-2.

Al momento della redazione della tesi lo studio in oggetto è in via di completamento.

INDICE

INTRODUZIONE	pag 53
Doxorubicina	pag 53
Timochinone	pag 53
SCOPO DELLO STUDIO	pag 55
MATERIALI E METODI	
Doxorubicina e Timochinone	pag 55
Colture cellulari	pag 56
Analisi del ciclo cellulare	pag 56
Estrazione dell'RNA totale	pag 56
Real time qPCR	pag 56
RISULTATI	
Vitalità cellulare	pag 58
Analisi del ciclo cellulare	pag 59
qPCR Real Time	pag 59
DISCUSSIONE	pag 61
BIBLIOGRAFIA	pag 62

8.0 Effetti cellulari e molecolari del trattamento combinato di Doxorubicina e Timochinone sulle linee di carcinoma del colon HT-29 e Caco-2

Una grande varietà di chinoni ha mostrato in passato interessanti proprietà farmacologiche tra cui diverse attività antitumorali ⁽¹⁾.

8.1 Doxorubicina

L'antrachinone Doxorubicina è un metabolita dello *Streptomyces*, clinicamente utilizzato nel trattamento di tumori quali sarcomi dei tessuti molli, linfomi e diversi tipi di carcinoma.

La terapia risulta comunque limitata a causa della cumulativa tossicità cardiaca e da una precoce apparizione di farmaco-resistenza ⁽²⁾.

8.2 Timochinone

Il para-benzochinone Timochinone è il principio attivo della pianta *Nigella sativa* ed è il responsabile degli effetti antiossidanti e antineoplastici di queste spezie.

Il Timochinone ha una tossicità molto bassa, ma una promettente attività anti-tumorale, inducendo l'apoptosi in modo sia p53 dipendente che p53 indipendente, oltre che mostrare una riduzione della crescita tumorale e un'induzione del blocco del ciclo cellulare in alcuni modelli di xenografia. ⁽³⁾

8.3 SCOPO DEL PROGETTO

Scopo del progetto è stato testare gli effetti cellulari e molecolari del trattamento combinato di un chinone utilizzato in clinica per la terapia di molti tipi di cancro, quale la Doxorubicina, con un altro chinone, il Timochinone, rivelatosi molto interessante da un punto di vista clinico per la sua bassa tossicità.

8.4 MATERIALI E METODI

Doxorubicina e Timochinone

I farmaci sono stati acquistati dalla ditta SIGMA-ALDRICH ed utilizzati alla concentrazione di 6 µg/ml per quanto riguarda la Doxorubicina e 10 µM il Timochinone.

Linee cellulari

Le linee cellulari utilizzate per questo progetto sono state 2: le HT-29 precedentemente descritte e le Caco-2.

Le Caco-2 in particolare sono una linea cellulare continua di carcinoma del colon ottenuta da un adenocarcinoma colo rettale e sono caratterizzate, nonostante la loro provenienza da tessuto neoplastico da un'alta capacità differenziativa.

In coltura infatti esse tendono ad avere caratteristiche morfologiche e funzionali classiche degli enterociti.

Le cellule sono state coltivate come descritto precedentemente.

Curve di crescita

Le curve di crescita sono state effettuate utilizzando un test colorimetrico con Alamar Blue (Invitrogen) diluito 1:10 in terreno.

Il reagente viene metabolizzato ed aumenta la fluorescenza in modo proporzionale alla quantità di cellule, rendendo possibile una quantificazione precisa del numero di cellule in coltura tramite letture effettuate con lo strumento Victor² (Perkin Elmer).

La prima misurazione è stata effettuata 4 ore dopo l'aggiunta di Alamar blue, come da protocollo fornito dal produttore.

L'esperimento è stato svolto in triplicati indipendenti.

Analisi del ciclo cellulare

L'analisi del ciclo cellulare è stata effettuata tramite citofluorimetria a flusso con incorporazione di propidio ioduro, come descritto precedentemente.

Tre esperimenti indipendenti sono stati effettuati su cellule trattate e non trattate.

Real time qPCR

Le analisi di espressione genica sono state effettuate tramite real time PCR come descritto precedentemente. I geni studiati sono stati Bcl-2-associated X protein (BAX), B-cell lymphoma 2 (BCL-2), B-cell lymphoma-extra large (BCL-XL) e Ciclina B, in virtù delle loro fondamentali azioni sull'apoptosi e sul controllo del ciclo cellulare. Tutti gli esperimenti sono stati effettuati in triplicato ed i

risultati sono stati normalizzati mediante Beta-2 microglobulina (B2M).

8.5 RISULTATI

Crescita cellulare

Le analisi della crescita hanno mostrato per entrambe le linee cellulari un forte effetto di inibizione della crescita con entrambi i chinoni, sensibile già dalle 24 ore successive al trattamento sia con Doxorubicina che con Timochinone. In particolare le cellule HT-29 risultano essere più sensibili alla Doxorubicina, mentre le Caco-2 hanno una risposta migliore al Timochinone.

Il trattamento combinato con entrambi i farmaci porta ad una drastica diminuzione della crescita cellulare in entrambi i nostri modelli, sensibilmente superiore ai singoli trattamenti (Fig. 9).

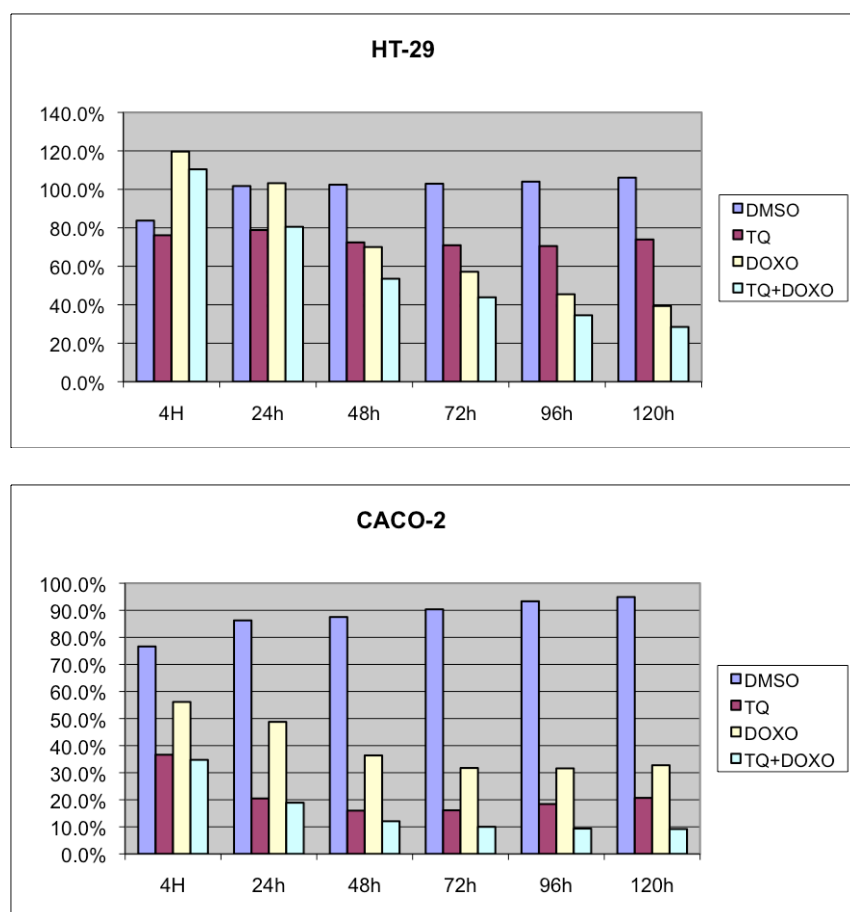


Figura 9: Crescita cellulare nelle cellule HT-29 e CACO-2 (dati normalizzati rispetto a controllo non trattato)

Analisi del ciclo cellulare

Il ciclo cellulare è stato analizzato a 72 ore dall'inizio del trattamento, ed ha mostrato una normale distribuzione per quanto riguarda le Caco-2 sia con i singoli trattamenti che per quanto riguarda il trattamento combinato.

Le HT-29 mostrano invece un blocco del ciclo cellulare indotto dalla doxorubicina, con un sensibile aumento della percentuale di cellule in fase G2/M.

Analisi dell'espressione genica con Real time PCR

Le analisi di Real time PCR hanno mostrato un'effettiva diminuzione nell'espressione dei geni antiapoptotici presi in considerazione, BCL-2 e BCL-XL nei trattamenti con doxorubicina e nel trattamento combinato, unita ad un'aumento del pro-apoptotico BAX nelle cellule Caco-2.

Il trattamento solo con Timochinone mostra una lieve diminuzione (circa del 20%) nell'espressione di BCL-2 E BCL-XL.

Gli effetti più interessanti risultano comunque quelli dati dal trattamento combinato, il quale porta ad una diminuzione maggiore rispetto al trattamento con sola Doxorubicina in entrambe le linee cellulari dei geni BCL-2 e BCL-XL.

La Ciclina B in entrambe le linee mostra una diminuzione dell'80% in seguito ai trattamenti con doxorubicina ed al trattamento combinato (Fig.10).

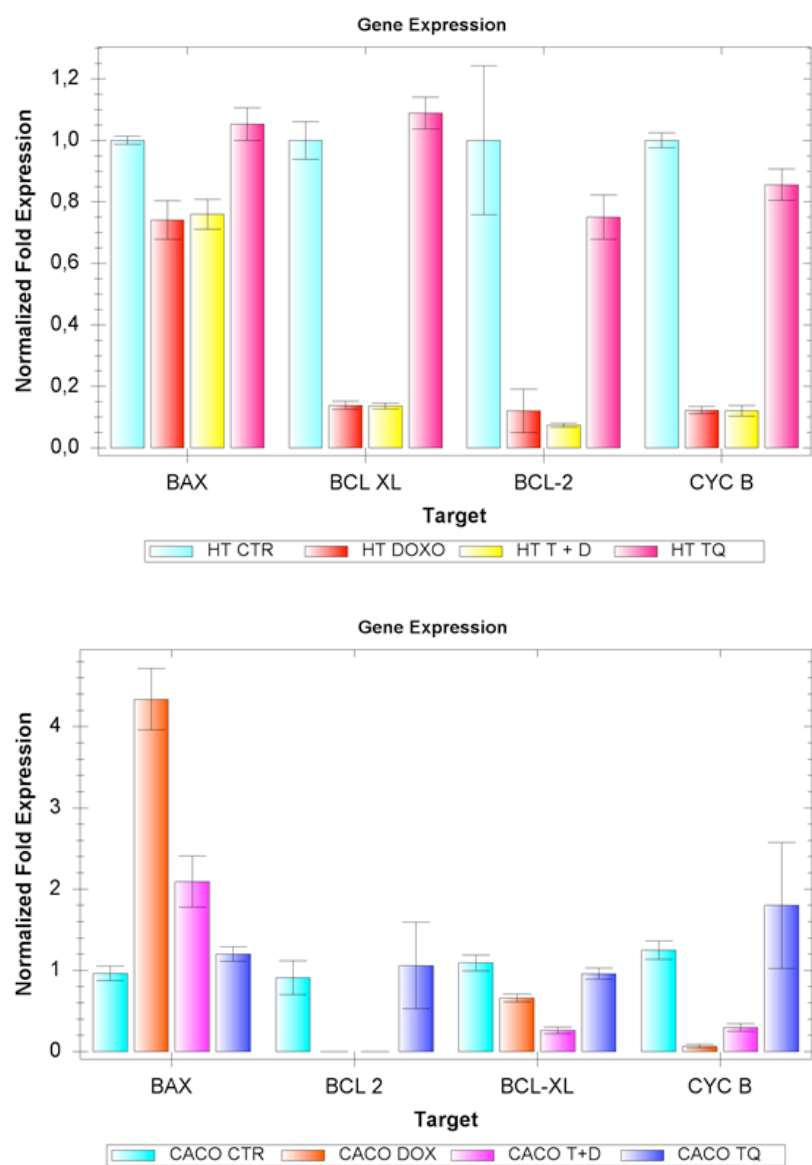


Fig. 10: espressione dei geni BAX, BCL-2, BCL-XL, CYC B in real time PCR, dati normalizzati rispetto alla Beta 2 microglobulina (B2M)

8.6 DISCUSSIONE

I farmaci presi in esame mostrano una forte azione anti-proliferativa in entrambe le linee cellulari, la sperimentazione *in vitro* del Timochinone ci ha permesso di verificarne gli effetti diretti nei nostri modelli. Entrambi i farmaci portano le cellule analizzate verso un imponente processo apoptotico che, come mostrano i dati ottenuti tramite real time PCR è dovuto sia all'abbassamento nei valori di espressione di importanti fattori anti-apoptotici, sia, nel caso delle Caco-2 ad un aumento di uno dei fattori primari dell'apoptosi quale BAX.

I dati ottenuti con le colture cellulari mostrano come i due farmaci, se utilizzati contemporaneamente, abbiano un effetto maggiore rispetto ai singoli trattamenti, andando quindi ad integrare un già alto potere anti-proliferativo.

In particolare il Timochinone mostra un potenziale apoptotico elevato che, nel caso delle HT-29 va a sommarsi con quello proprio della Doxorubicina e alla sua capacità di introdurre un blocco nel ciclo cellulare in fase G2/M.

Gli ottimi risultati ottenuti mostrano quindi importanti evidenze sulla possibilità di impiego di Timochinone in aggiunta al trattamento con Doxorubicina, ipotesi che andrà ovviamente approfondita da ulteriori studi, soprattutto riguardanti l'azione diretta del Timochinone sull'apoptosi, ma che risultano molto interessanti soprattutto data la difficoltà di impiego della doxorubicina dovuta essenzialmente ad una alta tossicità.

Il timochinone da questo punto di vista potrebbe quindi rivelarsi un valido approccio terapeutico sia usato singolarmente che in associazione alla doxorubicina, aumentando quindi gli effetti della terapia senza necessariamente incrementare le dosi di chinone utilizzate.

BIBLIOGRAFIA

1. Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ (2009) **Impact of natural products on developing new anti-cancer agents**. Chem Rev 109:3012-3043
2. Robert J (1998) Anthracyclines . In: Grochow LB, Ames MM (eds) **A clinician guide to chemotherapy, pharmacokinetic and pharmacodynamics**, William & Wilkins, Baltimore, pp 93-173
3. El Mahdy MA, Zhu Q, Wang QE, Wani G, Wani AA (2005) **Thymoquinone induces apoptosis through activation of caspase 8 and mitochondrial events in p53 null myeloblastic leukemia HL-60 cells**. Int. J. Cancer 117:409-417